



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0080580
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 11월 14일
Date of Application NOV 14, 2003

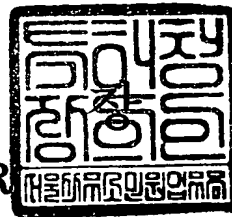
출원인 : 한국생명공학연구원
Applicant(s) Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology



2003 년 12 월 30 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.11.14
【발명의 명칭】	감자 더듬이 병원성 균종의 groEL 2 유전자를 이용한 감자 더듬이 병원성 균종의 동정방법
【발명의 영문명칭】	Identification of Streptomyces sp. causing potato scab by using analysis of groEL2 sequences
【출원인】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【대리인】	
【성명】	허상훈
【대리인코드】	9-1998-000602-6
【포괄위임등록번호】	2002-063992-2
【대리인】	
【성명】	백남훈
【대리인코드】	9-1998-000256-5
【포괄위임등록번호】	2002-063897-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김범준
【성명의 영문표기】	KIM, Bum-Joon
【주민등록번호】	681008-1042511
【우편번호】	122-802
【주소】	서울특별시 은평구 갈현2동 227-34호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김창진
【성명의 영문표기】	KIM, Chang-Jin
【주민등록번호】	550828-1067921
【우편번호】	305-340
【주소】	대전광역시 유성구 도룡동 391 타운하우스 7동 203호
【국적】	KR



【발명자】

【성명의 국문표기】	고영환
【성명의 영문표기】	K0,Young Hwan
【주민등록번호】	570805-1047711
【우편번호】	690-121
【주소】	제주도 제주시 아라1동 1709-1 영광아파트 9-403
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	고정삼
【성명의 영문표기】	K0H,Jeong-Sam
【주민등록번호】	481003-1162418
【우편번호】	690-122
【주소】	제주도 제주시 아라2동 1468-8
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	박동진
【성명의 영문표기】	PARK,Dong-Jin
【주민등록번호】	611001-1251615
【우편번호】	306-759
【주소】	대전광역시 대덕구 법2동 보람아파트 113동 1106호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	이향범
【성명의 영문표기】	LEE,Hyang Burm
【주민등록번호】	630518-1464321
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 126동 803호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	김홍
【성명의 영문표기】	KIM,Hong
【주민등록번호】	750804-1068915

【우편번호】 110-460
【주소】 서울특별시 종로구 연건동 28
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 김선현
【성명의 영문표기】 KIM, Sun-hyun
【주민등록번호】 790829-2108811
【우편번호】 110-460
【주소】 서울특별시 종로구 연건동 28
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 21
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
허상훈 (인) 대리인
백남훈 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 31 면 31,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 5 항 269,000 원
【합계】 329,000 원
【감면사유】 정부출연연구기관
【감면후 수수료】 164,500 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통



【요약서】

【요약】

본 발명은 감자 더덩이 병원성 균종의 *groEL2* 유전자를 이용한 감자더덩이 병원성 균종의 동정방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 모든 스트렙토마이세스 속 균종의 *groEL2* 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머를 이용하여 감자 더덩이병과 연관되어 있다고 알려진 표준 균주의 *groEL2* 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 감자 더덩이 병원성 균종을 동정하는 방법에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 기존의 형태학적 분류법이 갖는 시간, 정확성의 문제점을 해소하며, 요즘 일반적으로 사용되고 있는 16S rRNA 동정법의 근접한 균종 간의 정확한 분류가 어려운 문제점 및 16S-23S ITS를 표적으로 한 동정방법의 문제점을 해결하여, 간편하고 경제적이며 정확성을 높인 감자 더덩이 병원성 균종의 동정방법으로 향후 이들의 동정에 널리 이용될 수 있다.

【대표도】

도 2

【색인어】

감자 더덩이병, *groEL2* 유전자, 특이적 프라이머

【명세서】

【발명의 명칭】

감자 더듬이 병원성 균종의 *groEL2* 유전자를 이용한 감자 더듬이 병원성 균종의 동정 방법{Identification of Streptomyces sp. causing potato scab by using analysis of *groEL2* sequences}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 스트렙토마이세스 속 특이적 프라이머를 이용한 감자 더듬이 병원성 균종으로 알려진 표준균주 DNA의 648-bp *groEL2* 유전자 분절 증폭산물을 전기영동 사진으로 나타낸 것이다.

도 2는 선출원한 제2003-24656호의 스트렙토마이세스 표준균주 40 주 *groEL2* 420-bp 염기서열와 본 발명에서 분석한 감자 더듬이 병원성 표준균주 15주 및 분리균주 20 주의 *groEL2* 420-bp 염기서열로 구성된 계통수를 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<3> 본 발명은 감자 더듬이 병원성 균종의 *groEL2* 유전자를 이용한 감자더듬이 병원성 균종의 동정방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 모든 스트렙토마이세스 속 균종의 *groEL2* 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머를 이용하여 감자 더듬이병과 연관되어 있다고 알려진

표준 균주의 *groEL2* 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 감자 더듬이 병원성 균종을 동정하는 방법에 관한 것이다.

- <4> 미생물 중에서 스트렙토마이세스 속 균은 그 종(species)이 세균 중에서 가장 다양할 뿐 아니라, 같은 종 내에서도 서로 다른 생리 대사 능력을 보유하고 있다[Anderson AS, Wellington EM. The taxonomy of Streptomyces and related genera. Int J Syst Evol Microbiol. 2001 51(3):797-814]. 따라서, 많은 종류의 생리 활성 물질이 방선균의 대사 산물로부터 개발되고 있다. 비록 대부분의 스트렙토마이세스 속에 속하는 균종이 식물 및 동물에 질병을 유발하지 않으나, 일부는 감자에 더듬이 병(scab)을 일으킬 수 있다. 이러한 감자 더듬이 병은 감자의 상품성을 현저히 떨어뜨리기 때문에 이 병원균의 정확한 동정은 향후 이 병의 방제 및 농약 개발에 중요한 기초를 제공한다는 점에서 중요하다고 할 수 있다.

- <5> 감자에 더듬이병(scab)을 일으키는 스트렙토마이세스 균종은 주로 세 균주 스트렙토마이세스 스케비스(*S. scabiei*), 스트렙토마이세스 에시디스케비스(*S. acidiscabies*) 및 스트렙토마이세스 터지디스케비스(*S. turgidiscabies*)에 의해 일어나고 부분적으로는 이들 균종 이외의 스트렙토마이세스 균종에 의해 일어난다고 알려져 있다. 스트렙토마이세스 스케비스는 이들 균종 중에서 가장 주요한 원인균으로서 유전적으로 매우 다양한 집단으로 구성되어진 것으로 알려져 있다.

- <6> 스트렙토마이세스 속 균은 세균 중에서 가장 종류가 다양하고 또한 다른 미생물에 비해 상대적으로 발육 속도가 느리기 때문에, 생화학적인 방법 혹은 생리학

적인 방법으로 균종 분류가 어렵다는 단점을 가지고 있다[Skerman, V. B. D., McGowan, V., Sneath, P. H. A. (ed): Approved Lists of Bacterial Names. Int. J. Syst. Bacteriol. 30:225-420 (1980)]. 따라서, 감자 더듬이 병원성 균종의 동정도 여러 미생물학자들에 의해 지방산 분석법, DNA-DNA 부합화법, 및 16S rRNA 유전자 분석법 등의 여러 방법이 연구되어 왔다. 이들 여러 방법 중에서 16S rRNA 유전자 분석법은 세균간의 계통학적 관계를 밝히는 데에 있어서 혹은 균 종을 동정하는 데에 있어서 탁월한 장점을 보인다고 알려져 있고 이 병원성 균종의 동정에도 역시 가장 널리 이용되고 있다. 그러나, 이 방법은 상당히 근접한 균종 간에 있어서 16S rRNA 유전자 염기서열의 보존성으로 인하여 정확한 분류가 상당히 어려운 실정이다. 따라서, 이들 이외에 새로운 대체 유전자를 이용한 감자 더듬이 병원성 균의 동정 방법의 확립이 필요하다. 최근에 이러한 16S rRNA 유전자 분석법의 단점을 보완하기 위하여 이 유전자에 비해 염기서열 변이가 높은 지역인 16S-23S ITS 부위를 표적으로 하여 균 동정을 수행한 결과가 발표되었으나, 이 방법 역시 표적 유전자가 한 개체 안에 서로 다른 염기서열을 갖는 등 표적 유전자의 문제점으로 인하여 감자 더듬이 병원성 균종의 분류 및 동정에 적합하지 않다는 사실이 알려졌다. 따라서, 감자 더듬이 병원성 균의 정확한 동정을 위해서는 새로운 유전자를 표적으로 하는 새로운 동정법의 개발이 필요한 실정이다. 본 연구자들은 앞서 출원한 특허(출원번호 제2003-24656호)에서 스트렙토마이세스 속 균종 분류에 이용될 수 있는 새로운 *groEL2* 비교염기서열 분석방법을 개발하였고 이 방법이 스트렙토마이세스 균종의 동정에 적합하다는 사실을 보여준 바 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <7> 이에, 본 발명자들은 선출원된 제2003-24656호를 기초로 하여 스트렙토마이세스 균종에 속하는 감자 더덩이 병원성 균종을 동정할 수 있는 *groEL2* 비교염기서열 분석방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- <8> 따라서, 본 발명은 감자 더덩이 병원성 균종의 *groEL2* 유전자 분절을 제공하는데 그 목적이 있다.
- <9> 또한, 본 발명은 선출원된 제2003-24656호에서 제작한 프라이머로 *groEL2* 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 감자 더덩이 병원성 균종을 동정하는 방법을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- <10> 본 발명은 감자 더덩이 병원성 균종의 *groEL2* 유전자 분절을 그 특징으로 한다.
- <11> 또한, 모든 스트렙토마이세스 속 균종의 *groEL2* 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머로 *groEL2* 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 감자 더덩이 병원성 균종을 동정하는 방법을 또 다른 특징으로 한다.
- <12> 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.
- <13> 본 발명은 모든 스트렙토마이세스 속 균종의 *groEL2* 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머를 이용하여 감자 더덩이 병과 연관되어 있다고 알려진 표준 균주의 *groEL2* 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 감자 더덩이 병원성 균종을 동정하는 방법에 관한 것이다.

<14> 본 발명은

<15> 1) 스트렙토마이세스 속 균주의 *groEL2* 유전자 분절을 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 이용하여 목적 균주의 *groEL2* 유전자 분절을 증폭하는 단계;

<16> 2) 상기 증폭된 *groEL2* 유전자 분절의 염기서열을 분석하는 단계; 및

<17> 3) 상기에서 분석된 염기서열과 감자 더덩이 병과 연관된 표준 균주의 *groEL2* 유전자 분절의 염기서열을 비교하는 단계를 포함하는 감자 더덩이 병원성 균종의 동정방법에 그 특징이 있다.

<18> 상기 1) 단계에서 *groEL2* 유전자 분절을 증폭시키기 위하여 스트렙토마이세스 속에 특이적인 프라이머를 제조하는 데 있어, 현재 전체 *groEL2* 염기서열이 보고된 스트렙토마이세스 리비단스(*S. lividans*)와 스트렙토마이세스 알버스(*S. albus*)의 염기서열 및 스트렙토마이세스와 계통분류학적으로 밀접한 슈카무렐라 파우로메타볼라(*T. paurometabola*)의 염기서열과 비교하여 가장 염기서열이 잘 보존된 부위를 각각 정방향, 역방향 프라이머로 선정한다. 그 이후에 본 발명에서 분석하고자 하는 감자 더덩이 병과 연관된 것으로 알려진 표준균주 15종의 DNA를 대상으로 하여 제조된 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄반응이 모든 균종에서 648-bp의 증폭산물을 생산하는지를 확인한다.

<19> 이때, 바람직한 프라이머로는 서열번호 20 또는 서열번호 21로 표시되는 것이다.

<20> 상기 스트렙토마이세스 속 균주에 특이적인 프라이머를 이용하여 목적 균주의 *groEL2* 유전자 분절을 PCR 기법으로 증폭하여 염기서열을 분석한다. 이때, 표준 균주의 *groEL2* 유전자 분절의 데이터베이스는 서열목록상 서열번호 1 내지 서열번호 19로 표시되는 염기서열이다.

<21> 본 발명에 따른 동정방법에 따라 다음 표 1에 나타난 표준 균주 15주와 강원도 및 제주도 유래의 감자 더덩이 병원 조직으로부터 분리된 20주를 대상으로 염기서열을 분석하였다.

<22> 【표 1】

감자더덩이 병원성 표준 균주 (potato scabies causing reference strains)					
No	Name	Source	No	Name	Source
1	<i>S. scabiei</i>	ATCC 49173 ^T	2	<i>S. scabiei</i>	D8MZ 40961
3	<i>S. scabiei</i>	D8MZ 40962	4	<i>S. scabiei</i>	IFO3111
5	<i>S. scabiei</i>	IFO 13767	6	<i>S. scabiei</i>	IFO 13768
7	<i>S. scabiei</i>	IFO 12914	8	<i>S. aoidiscabiei</i>	ATCC 49003 ^T
9	<i>S. burgidiscabiei</i>	ATCC 700248 ^T	10	<i>S. burgidiscabiei</i>	IFO 16079
11	<i>S. burgidiscabiei</i>	IFO 16080	12	<i>S. burgidiscabiei</i>	IFO 16081
13	<i>S. botryoscedis</i>	IFO 13023	14	<i>S. d'haeschei</i>	IFO 13399
15	<i>S. mayapawansis</i>	IFO 3784			
감자더덩이 병원성 분리 균주					
강원도 분리 균주					
16	Kangwon-820	Kangwon-do	17	Kangwon-827	Kangwon-do
18	Kangwon-829	Kangwon-do	19	Kangwon-832	Kangwon-do
20	Kangwon-833	Kangwon-do	21	Kangwon-834	Kangwon-do
22	Kangwon-848	Kangwon-do	23	Kangwon-851	Kangwon-do
24	Kangwon-853	Kangwon-do	25	Kangwon-856	Kangwon-do
26	Kangwon-858	Kangwon-do	27	Kangwon-859	Kangwon-do
28	Kangwon-871	Kangwon-do			
제주도 분리 균주					
29	Jeju-H11	Jeju-do	30	Jeju-H12	Jeju-do
31	Jeju-H16	Jeju-do	32	Jeju-H17	Jeju-do
33	Jeju-H18	Jeju-do	34	Jeju-H19	Jeju-do
35	Jeju-H20	Jeju-do			

<23> 이렇게 분석된 염기서열을 다정렬(multialignment)하여 먼저 15주 표준 균주의 염기서열을 서로 비교해 본 결과, 첫째 감자 더덩이 병을 유발한다고 알려진 세 균종 스트렙토마이세스 스케비스, 스트렙토마이세스 에시디스케비스 및 스트렙토마이세스 터지디스케비스는 모두 서로 다른 염기서열을 보이면서 계통수에서 서로 다른 그룹에 속함을 확인할 수 있었다. 스트렙토마이세스 스케비스는 서로 밀접한 유전형으로 구성된 다른 병원성균 두 종과는 달리 서로 상당히 다양한 유전형으로 구성되어 있음을 계통수 상에서 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 이 균종이 서로 다양한 유전형으로 구성되어 있다는 기존의 보고와 일치하는 결과이다.

즉, 스트렙토마이세스 스케비스에 속하는 7 주 표준 균주 각각의 420-bp *groEL2* 염기서열의 상동성을 서로 비교해 본 결과 88.9 ~ 100%까지의 매우 넓은 범위의 염기서열 상동성을 보임을 확인할 수 있었다. 염기서열 상동성에 기초하여 완성된 계통수에 근거하여 스트렙토마이세스 스케비스는 모두 4 개의 그룹으로 구분할 수 있었다. 그룹 I은 서로 100%의 염기서열 상동성을 보이는 스트렙토마이세스 스케비스 대표 표준 균주인 ATCC 49173T와 DSMZ 40962 두 개의 표준 균주를 포함하고, 그룹 II는 서로 98.1%의 염기서열 상동성을 보이는 IFO 12914와 IFO 3111 두 개의 표준 균주를 포함하며, 그룹 III은 서로 100%의 염기서열 상동성을 보이는 IFO 13767와 IFO 13768 두 개의 표준 균주를 포함하고, 마지막으로 그룹 IV는 DSMZ 40961 한 개의 표준 균주로 구성됨을 확인할 수 있었다. 스트렙토마이세스 스케비스 표준 균주 7주는 중간 염기서열 다양성(interspecies variation)을 보여주는 반면에 스트렙토마이세스 터지 디스케비스에 속하는 표준 균주 4 주(ATCC 700248T, IFO 16079, IFO 16080, IFO 16081)는 서로 100%의 염기서열 상동성을 보임을 확인할 수 있었다.

<24> 한편, 표준 균주와 목적 균주의 *groEL2* 염기서열을 분석한 후에 서열 비교하여 해당 균주인 것으로 결정을 내릴 때, 정렬된 데이터베이스에 동정하고자 하는 균의 염기서열을 분석하여 데이터베이스에 추가시킨 후에 다시 염기서열 정렬을 수행한 후 계통도를 완성하면 해당되는 균종에 근접하여 가지를 형성하게 되어 계통도로 균종을 결정할 수도 있다.

<25> 따라서, 본 발명으로 분석된 15 주의 감자 더덩이 병원성균의 420-bp *groEL2* 염기서열 데이터베이스와 이를 이용한 비교 염기서열방법은 감자 더덩이 병원성균을 종 수준 혹은 그 이하의 유전형 수준까지의 동정에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다

<26> 이하, 본 발명은 다음 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명하겠는 바, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

<27> 참고예: 균주

<28> 감자에 더뎡이 병을 유발한다고 알려진 스트렙토마이세스 스케비스 7주, 스트렙토마이세스 에시디스케비스 1주 및 스트렙토마이세스 터지디스케비스 4주 및 이들 균주에 계통 분류학적으로 밀접한 관계가 있는 스트렙토마이세스 보트로펜시스(*S. bottropensis*) 1주, 스트렙토마이세스 디사스타토크로모진스(*S. disastatochromogenes*) 1주, 스트렙토마이세스 네야가웬시스(*S. neyagawaensis*) 1주 총 15주의 표준균주를 대상으로 하여 *groEL2* 염기서열을 분석하였고 또한 강원도 및 제주도 유래 감자의 더뎡이 병원 조직으로부터 분리된 총 20 주의 분리 균주를 대상으로 하여 *groEL2* 염기서열을 분석하였다.

<29> 실시예 1: 스트렙토마이세스 속 *groEL2* 420-bp 분절의 제조

<30> 1) DNA 추출

<31> BB/P(Bead beater phenol) 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 균의 집락을 따내, TEN 버퍼(Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM: pH 8.0)에 부유시킨 후에 직경 0.1 mm 초자구(diameter 0.1 mm; Biospec Products, Bartlesville, Okla., U.S.A.) 100 μ l(packing volume)와 페놀 : 클로로포름 : 이소프로필알코올 (50:49:1) 용액 100 μ l를 함께 부유시켜 mini beater로 1분간 진탕하여 균체를 파쇄하였다. 균 파쇄액은 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하고 상청액 100 μ l을 새로운 튜브에 옮긴 후, 60 μ l의 이소프로필알코올을 섞고, 다시

15,000 rpm으로 15 분간 원심분리하였다. 침전물은 70% 에탄올로 세척한 후 TE(pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 버퍼 60 μ l로 DNA를 회수하였다.

<32> 2) 중합효소 연쇄반응에 의한 *groEL2* 유전자 증폭

<33> 선출원한 특허(출원번호 제2003-24656호)에서 개발한 스트렙토마이세스 속 특이적인 정방향 프라이머(STGROF1)와 역방향 프라이머(STGROR2)를 제조하여 사용하였다. PCR 반응은 2 U의 Taq 중합효소, 10 mM dNTP, 10 mM 트리스-HCl (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$ 를 포함하는 AccuPower PCR PreMix(Bioneer, Korea)을 이용하였다. 주형 DNA 50 ng, 프라이머 SRPOF1, SRPOR2 각각 20 pmol 넣고, 증류수를 최종 부피가 20 μ l가 되도록 첨가하여 혼합물을 만들었다. PCR은 첫 번째 변성(first denature) 95 $^{\circ}C$ 로 5분, 30 사이클로 열변성(denaturation) 95 $^{\circ}C$ 1분 결합(annealing) 62 $^{\circ}C$ 45초, 신장(extention) 72 $^{\circ}C$ 1분 30초, 마지막 신장(final extention) 72 $^{\circ}C$ 5분으로 수행하였다[Model 9600 thermocycler, Perkin-Elmer cetus].

<34> 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과, 15주의 감자 더덩이 병원성 표준 균주 및 20주의 분리 균주에서 648-bp의 *groEL2* 유전자 분절을 생산함을 1% 아가로스 겔 전기영동 상에서 확인할 수 있었다[도 1].

<35> 3) 중합효소 연쇄반응 산물의 정제

<36> 1% 겔에 전기영동 후, 스트렙토마이세스 표준 균주 648-bp의 반응산물 부위의 겔을 자른 다음 새로운 튜브에 옮겨 DNA를 추출하였다. DNA 추출 및 정제는 Qiaex(Qiagen, Germany)

시스템을 이용하였다. Gel solubilizing solution QX1 500 μ l을 겔을 포함한 튜브에 첨가한 후 50 $^{\circ}$ C에 15분간 방치하여 겔을 완전히 녹였다. 그 후 겔 비드를 10 μ l을 첨가하여 완전히 섞은 후에 50 $^{\circ}$ C에 15분간 방치하였다. 그 사이 1분 간격으로 튜브를 10초씩 vortex를 수행하여 비드가 골고루 퍼지도록 하였다. 이 후 QX1으로 1번, QF로 2번 세척한 후 45 $^{\circ}$ C에서 10분간 말린 후 TE 버퍼 20 μ l로 DNA을 회수하였다.

<37> 실시예 2: *groEL2* 분절의 자동염기서열 분석

<38> 자동 염기서열 분석은 겔 용출 산물을 주형 DNA로 사용하였다. 주형 DNA 60 ng, 프라이머 1.2 pmol, BigDye Terminator Cycle Sequencing kit(PE Applied Biosystems) 2 μ l을 섞고, 증류수를 첨가하여 총 부피 10 μ l로 제조하였다. 반응은 Perkin Elmer Cetus 9600을 사용하여, 95 $^{\circ}$ C 10 초, 60 $^{\circ}$ C 10 초, 60 $^{\circ}$ C 4 분으로 25 사이클로 실시하였다. 반응이 끝난 샘플은 에탄올 침전방법으로 DNA를 정제하였다. 즉, 증류수 180 μ l, 3M 소듐 아세테이트 10 μ l을 첨가하여 총 200 μ l로 만든 후, 이 혼합물에 2배 부피의 100% 에탄올을 첨가하여 잘 섞은 다음 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 그 후 70% 에탄올 500 μ l을 첨가한 후 15,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 DNA를 세척하였다. 그 후 DNA를 Deionized Formimide(PE Applied Biosystems)로 회수하였다. 이렇게 정제된 DNA를 95 $^{\circ}$ C로 5분간 반응하여 단일가닥 DNA로 만든 후, ABI 3100 시스템을 이용하여 2시간 30분 동안 전기영동하여 염기서열을 분석하였다.

<39> 염기서열 분석 방법은 정방향 프라이머 STGROF1을 사용하여 한쪽으로 염기서열을 분석하였고, 전체 648-bp 중에서 420-bp의 염기서열을 결정하였다.

<40> 증폭된 중합효소 연쇄반응 산물을 전기에서 상술한 대로 정제한 후 클로닝 과정 없이 직접 자동염기서열분석 방법으로 선출원한 특허(출원번호 제2003-24656호)에서 상술한 것처럼 스트렙토마이세스 알버스(*S. albus*)[GenBank No. M76658]의 전체 *groEL2* 염기서열 순서를 기준으로 232번째 염기에서 631번째 염기까지 420-bp의 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 어떤 모호한 결과(표적유전자가 genome 상에 여러 개 존재하고, 그들 사이의 염기서열이 다르면 다른 부위의 염기서열은 직접염기서열 분석상에서 염기서열이 겹쳐 나오기 때문에 정확한 염기서열을 결정할 수 없다) 없이 35주 모두 420-bp의 염기를 결정할 수 있었다.

<41> 실시예 3: 감자 더듬이병 분리 균주 20 주의 420-bp *groEL2* 유전자 비교염기서열 분석에 의한 균 동정

<42> 완성된 55 주의 표준균주 데이터베이스[40주(출원번호 제2003-24656호), 15 주(본 특허)]가 실제로 균 동정에 적용될 수 있는지를 확인하기 위하여, 상기 표 1에서 보여지는 것처럼 강원도 분리 균주 13 주, 제주도 분리 균주 7주 총 20 주의 감자더듬이 병원성 균을 대상으로 *groEL2* 유전자 비교염기서열 분석 방법에 의해 균 동정을 실시하였다.

<43> 그 결과 20 주 모두 감자 더듬이 병원성균인 세 개의 균종(*S. scabiei*, *S. acidiscabies* 및 *S. turgidiscabies*)에 속함을 확인할 수 있었다. 총 20 주 중에서 11 주[강원도 9 주(Kangwon-S20, Kangwon-S28, Kangwon-S32, Kangwon-S33, Kangwon-S34, Kangwon-S53, Kangwon-S56, Kangwon-S58, Kangwon-S59), 제주도 2 주(Jeju-H11, Jeju-H16)], 즉 55% 가 스트렙토마이세스 스캐비스에 속함을 확인하였다. 다른 연구 보고와 마찬가지로 이 균이 가장 높은 빈도로 분리되었다. 이들 균종은 각각 스트렙토마이세스 스캐비스의 4 개의 그룹 중에서 3 개의 그룹(I, III, IV)에 속함을 확인하였다. 이들 중에서 가장 많은 빈도 즉 7

주(Kangwon-S28, Kangwon-S32, Kangwon-S33, Kangwon-S53, Kangwon-S56, Kangwon-S58, Jeju-H16)가 서로 98.8 ~ 100%의 염기서열 상동성을 보이면서 그룹 I에 속하였다. 이 들 중에서 3 주(Kangwon-S20, Kangwon-S59, Jeju-H11)는 서로 99.5 ~ 100%의 염기서열 상동성을 보이면서 그룹 II에 속함을 확인하였다. 나머지 1 주(Kangwon-S34)는 표준균주인 DSM 40961과 99.3%의 염기서열 상동성을 보이면서 그룹 IV에 속하였다[도 2].

<44> 20 주 중에서 5 주[강원 1 주(Kangwon -S71), 제주도 4 주(Jeju-H12, Jeju-H17, Jeju-H18, Jeju-H20)], 즉 25%의 분리빈도로 서로 96.9 ~ 100%의 염기서열 상동성을 보이면서 스트렙토마이세스 에시디스케비스로 동정되었다. 또한, 4 주[강원도 3 주(Kangwon-S27, Kangwon-S48, Kangwon-S51), 제주도 1 주(Jeju-H19)]는 20%의 분리 빈도로 서로 100%의 염기서열 상동성을 보이면서 스트렙토마이세스 터지디스케비스로 동정되었다.

<45> 따라서, 본 발명으로 분석된 15 주의 감자 더덩이 병원성 균의 420-bp *groEL2* 염기서열 데이터베이스와 이를 이용한 비교 염기서열방법은 감자 더덩이 병원성균을 종 수준 혹은 그 이하의 유전형 수준까지의 동정에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다

【발명의 효과】

<46> 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 *groEL2* 유전자를 이용한 감자 더덩이 병원성 균종 동정방법은 기존의 형태학적 분류법이 갖는 시간, 정확성의 문제점을 해소하며, 요즘 일반적으로 사용되고 있는 16S rRNA 동정법의 근접한 균종 간의 정확한 분류가 어려운 문제점 및 16S-23S ITS를 표적으로 한 동정방법의 문제점을 해결하여 간편하고, 경제적이며 정확성을 높은 감자 더덩이 병원성 균종의 동정방법으로 향후 이들의 동정에 널리 이용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

서열번호 1 내지 서열번호 19로 표시되는 염기서열로 이루어진 군에서 선택되며, 감자 더덩이 병원성 균종의 *groEL2*의 분절 또는 이들의 단편을 포함하는 폴리뉴클레오타이드.

【청구항 2】

- 1) 스트렙토마이세스 속 균주의 *groEL2* 유전자 분절을 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 이용하여 목적 균주의 *groEL2* 유전자 분절을 증폭하는 단계;
- 2) 상기 증폭된 *groEL2* 유전자 분절의 염기서열을 분석하는 단계; 및
- 3) 상기에서 분석된 염기서열과 감자 더덩이 병과 연관된 표준 균주의 *groEL2* 유전자 분절의 염기서열을 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 감자 더덩이 병원성 균종의 동정방법.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 20의 염기서열을 포함하는 프라이머 및 서열번호 21의 염기서열을 포함하는 프라이머로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 프라이머인 것을 특징으로 하는 동정방법.



【청구항 4】

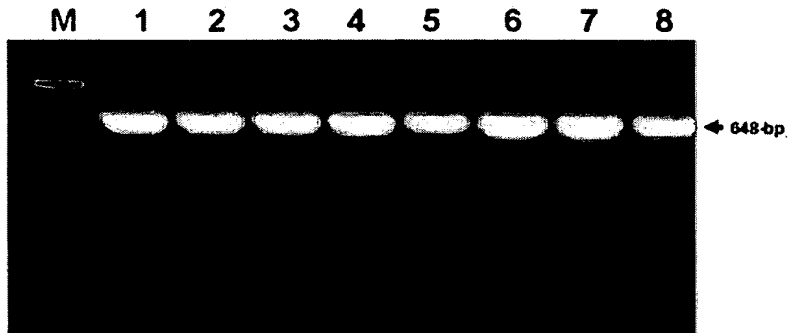
제 2 항에 있어서, 상기 표준 균주의 *groEL2* 유전자 분절은 서열번호 1 내지 서열번호 19로 표시되는 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 동정방법.

【청구항 5】

제 2 항에 있어서, 상기 3) 단계에서 목적 균주의 *groEL2* 유전자 분절의 염기서열을 표준 균주의 *groEL2* 유전자 분절의 염기서열에 대입하여 다정렬한 후 계통도를 완성하여 결정하는 것을 특징으로 하는 동정방법.

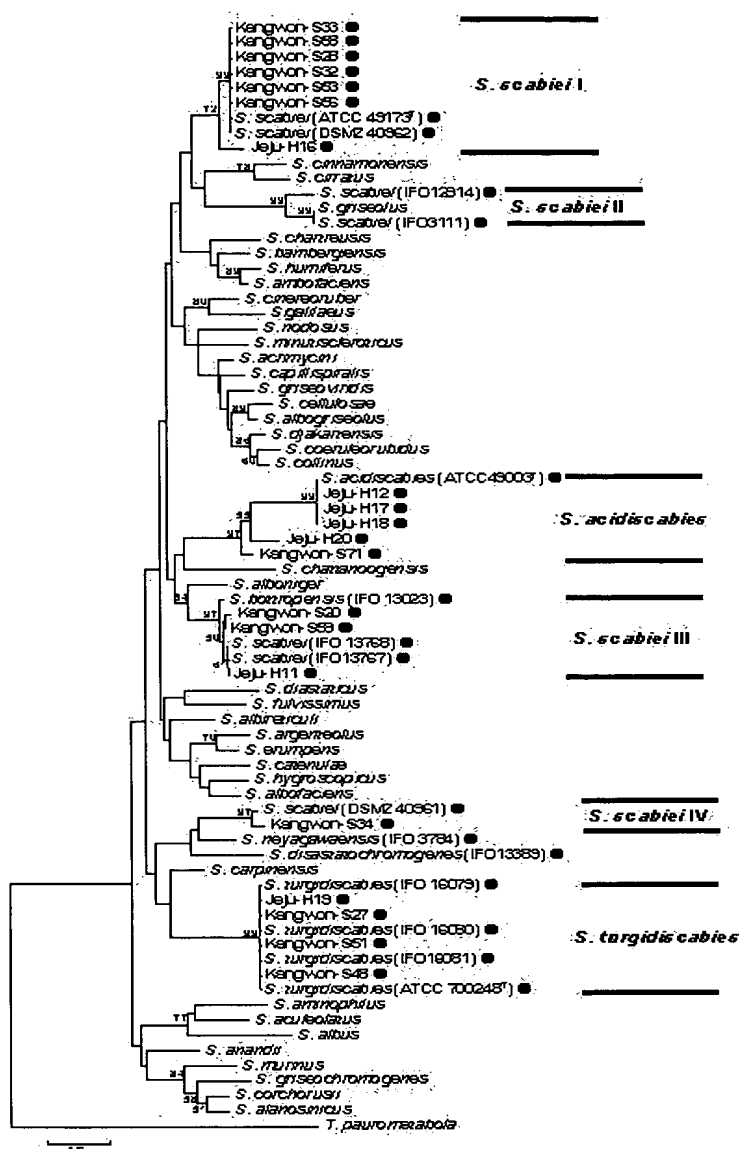
【도면】

【도 1】



- M: ϕ X 174을 *Hae*III 제한효소로 절단한 DNA 크기 마커,
1: *S. scabiei* ATCC 49173^T
2: *S. scabiei* DSMZ 40962
3: *S. acidiscabies* ATCC 49003^T
4: *S. furgidiscabies* ATCC 700248^T
5: Kangwon-S20, 6: Kangwon-S53, 7: Jeju-H11, 8: Jeju-H20

【도 2】



【서열목록】

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology <120>

Identification of *Streptomyces* sp. causing potato scab by using analysis of

groEL2 sequences <160> 21 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 420 <212>

DNA <213> S. scabiei ATCC 49173T <400> 1 aagaagacgg acgacgtcgc cggtgacggt

```

acgaccaccg cgaccgttct cgcccaggcg      60 ctcgtacgcg agggcctgcg caacgtcgcc
gccggtgcc aaccgatggc tctcaagcgc      120 ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc
ggcgccctgc tggagcaggc gaaggatgtc      180 gagaccaagg agcagatcgc ttccacggcc
tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc      240 gagtcatcg ccgaggcgat ggacaaggtc
ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag      300 tcccagacct tcggtctgga gctggagctc
accgagggta tgcgcttcga caagggtac       360 atctcggcgt acttcgccac cgacatggag
cggatggagg cgtcgctcga cgaccgtac       420

```

420 <210> 2 <211> 420 <212> DNA <213> S. scabiei DSMZ 40961 <400> 2

```

aagaagacgg acgacgtagc cggtagcggc acgaccaccg cgaccgtcct ggcccaggcg      60
ctggtccgcg agggcctgcg caacgtcgcc gccggcgcca aaccgatggc cctgaagcgc      120
ggtatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggtgcgctgc tcgaccaggc caaggaggtc      180
gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc      240
gagtcatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag      300
tcgcagacct tcgggcttga gcttgagctc accgagggca tgcgcttcga caagggtac      360
atctcggcgt acttcgcgac cgacatggag cgcatggagg ccgtgctcga ggaccctac      420

```

420 <210> 3 <211> 420 <212> DNA <213> S. scabiei DSMZ 40962 <400> 3

```

aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggc acgaccaccg cgaccgttct cgcccaggcg      60
ctcgtacgcg agggcctgcg caacgtcgcc gccggtgcc aaccgatggc tctcaagcgc      120
ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggcgccctgc tggagcaggc gaaggatgtc      180
gagaccaagg agcagatcgc ttccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc      240
gagtcatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag      300

```

tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggtg tgcgcttcga caagggtac 360

atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cggatggagg cgtcgctcga cgacccgtac 420

420 <210> 4 <211> 420 <212> DNA <213> S. scabiei IFO 3111 <400> 4

aagaagacgg acgacgtcgc cggcgacggt acgaccaccg ccaccgttct cgcccaggcg 60

ctcgtccgtg agggcctgcg caacgtcgcc gccggtgcca acccgatggc tctcaagcgt 120

ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc gccgccctgc tggagcaggc caaggacgtg 180

gagaccaagg agcagatcgc ttcgaccgcc tccatctccg ccgccgacac cgagatcggc 240

gccaagatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300

tcccagacct tcggtctgga gctggaactc accgagggtg tgcgcttcga caagggtac 360

atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggaga cgtcgcttcga cgacccgtac 420

420 <210> 5 <211> 420 <212> DNA <213> S. scabiei IFO 13767 <400> 5

aagaagacgg acgacgtagc cggtgacggc acgacgaccg cgaccgtcct ggcccaggcc 60

ctggtgcgcg agggctctgcg caacgtggcc gccggtgcca acccgatggc tctcaagcgc 120

ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc gccgccctgc tggagcaggc gaaggatgtc 180

gagaccaagg agcagatcgc ttccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240

gagctcatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300

tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggtg tgcgcttcga caagggtac 360

atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgacccgtac 420

420 <210> 6 <211> 420 <212> DNA <213> S. scabiei IFO 13768 <400> 6

aagaagacgg acgacgtagc cggtgacggc acgacgaccg cgaccgtcct ggcccaggcc 60

ctggtgcgcg agggctctgcg caacgtggcc gccggtgcca acccgatggc tctcaagcgc 120

ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggcgccctgc tggagcaggc gaaggatgtc 180

gagaccaagg agcagatcgc ttccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240

gagctcatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300

tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggtta tgcgcttcga caagggttac 360

atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgacccttac 420

420 <210> 7 <211> 420 <212> DNA <213> S. scabiei IF0 12914 <400> 7

aagaagacgg acgacgtcgc cggcgacggt acgaccaccg ccaccgttct cgcccaggcg 60

ctcgtccgcg agggcctgcg caacgtcgcc gcgggtgcca acccgatggc tctgaagcgt 120

ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc gccgtctgc tggagcaggc gaaggacgtg 180

gagaccaagg agcagatcgc ttccacggcc tccatctccg ctgccgacac cgagatcggc 240

gccaagatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300

tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggtta tgcgcttcga caagggttac 360

atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggaga cgtcgttcga cgacccttac 420

420 <210> 8 <211> 420 <212> DNA <213> S. acidiscabies ATCC 49003T <400>

8 aagaagacgg acgacgtagc cggtagcggc acgacgaccg cgacggctct ggcccaggca 60

ctggtccgcg agggcctccg caacgtcgcc gcaggcgcca acccgatggc cctgaagcgc 120

ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggcgcgctcc tggagcaggc gaaggacgtc 180

gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac gcagatcggc 240

gagctcatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac ggtcgaggag 300

tgcagacct tcggcctgga gcttgagctc accgagggtta tgcgcttcga caagggttac 360

atctcggcgt acttcgcgac cgacatggag cgcatggagt cgtccctgga cgacccttac 420

420 <210> 9 <211> 420 <212> DNA <213> S. turgidiscabies ATCC 700248T

<400> 9 aagaagacgg acgacgtagc cggtgacggc acgacgaccg cgaccgtcct ggcccaggcg

60 ctggtccgcg agggcctgcg caacgtggcc gcgggtgcga acccgatggc cctgaagcgc 120

ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggtgcgctgc tcgaccaggc gaaggaggtc 180

gagacgaagg agcagatcgc ttcgaccgcc tccatctccg ccgccgacac gcagatcggc 240

gagtcacatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300

tcccagacct tcggtctgga gctggaactc accgagggtg tgcgcttcga caagggtac 360

atctcggcgt acttcgcgac cgacatggag cgcatggagg cgtcgctcga ggaccctac 420

420 <210> 10 <211> 420 <212> DNA <213> S. turgidiscabies IFO 16079 <400>

10 aagaagacgg acgacgtagc cggtgacggc acgacgaccg cgaccgtcct ggcccaggcg 60

ctggtccgcg agggcctgcg caacgtggcc gcgggtgcga acccgatggc cctgaagcgc 120

ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggtgcgctgc tcgaccaggc gaaggaggtc 180

gagacgaagg agcagatcgc ttcgaccgcc tccatctccg ccgccgacac gcagatcggc 240

gagtcacatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300

tcccagacct tcggtctgga gctggaactc accgagggtg tgcgcttcga caagggtac 360

atctcggcgt acttcgcgac cgacatggag cgcatggagg cgtcgctcga ggaccctac 420

420 <210> 11 <211> 420 <212> DNA <213> S. turgidiscabies IFO 16080 <400>

11 aagaagacgg acgacgtagc cggtgacggc acgacgaccg cgaccgtcct ggcccaggcg 60

ctggtccgcg agggcctgcg caacgtggcc gcgggtgcga acccgatggc cctgaagcgc 120

ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggtgcgctgc tcgaccaggc gaaggaggtc 180

gagacgaagg agcagatcgc ttcgaccgcc tccatctccg ccgccgacac gcagatcggc 240



gagctcatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
 tcccagacct tcggtctgga gctggaactc accgagggtta tgcgcttcga caagggttac 360
 atctcggcgt acttcgacgac cgacatggag cgcatggagg cgtcgctcga ggaccctac 420
 420 <210> 12 <211> 420 <212> DNA <213> S. turgidiscabies IF0 16081 <400>
 12 aagaagacgg acgacgtagc cggtgacggc acgacgaccg cgaccgtcct ggcccaggcg 60
 ctggtccgcg agggcctgcg caacgtggcc gcgggtgca acccgatggc cctgaagcgc 120
 ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggtgcgtgc tcgaccaggc gaaggaggtc 180
 gagacgaagg agcagatcgc ttcgaccgcc tccatctccg ccgccgacac gcagatcggc 240
 gagctcatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
 tcccagacct tcggtctgga gctggaactc accgagggtta tgcgcttcga caagggttac 360
 atctcggcgt acttcgacgac cgacatggag cgcatggagg cgtcgctcga ggaccctac 420
 420 <210> 13 <211> 420 <212> DNA <213> S. bottropensis IF013023 <400>
 13 aagaagacgg acgacgtagc cggtgacggc acgacgaccg cgaccgtcct ggcccaggcc 60
 ctggtgcgcg agggctctgcg caacgtggcc gccggcgcca acccgatggc cctcaagcgc 120
 ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggccgctcgc tggagcaggc gaaggatgtc 180
 gagaccaagg agcagatcgc ttccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240
 gagctcatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
 tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggtta tgcgcttcga caagggttac 360
 atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgaccgtac 420
 420 <210> 14 <211> 420 <212> DNA <213> S. disastatochromogenes IF013389
 <400> 14 aagaagacgg acgacgtcgc cggtgacggt acgaccaccg cgaccgttct cgcccaggcc

60 ctggtcaagg aaggcctgcg caacgtagcc gccggcgcca acccgatggc cctcaagcgc 120

ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggtgcgctgc tcgaccaggc caaggaggtc 180

gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240

gagctgatcg ccgaggccat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300

tcgcagacct tcggtctgga gcttgagctc accgagggca tgcgcttcga caagggctac 360

atctcggcgt acttcgcgac cgacatggag cgcatggagg cggtcctgga ggaccctac 420

420 <210> 15 <211> 420 <212> DNA <213> S. neyagawaensis IFO 3784 <400>

15 aagaagacgg acgacgtcgc cggtgacggt acgaccaccg cgaccgtcct cgcccaggcg 60

ctcgtacgcg agggcctgcg caacgtcgcc gccggtgcca acccgatggc cctgaagcgc 120

ggtatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggtgcgctgc tcgaccaggc caaggaggtc 180

gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240

gagctgatcg ccgaggccat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300

tcgcagacct tcggtctgga gctcgagctc accgagggca tgcgcttcga caagggctac 360

atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgcatggagg cggtgctcga ggaccctac 420

420 <210> 16 <211> 420 <212> DNA <213> S. scabiei Korea isolate Jeju-H16

<400> 16 aagaagacgg acgacgtcgc cggtgacggt acgaccaccg cgaccgttct cgcccaggcg

60 ctcgtacgcg agggcctgcg caacgtcgcc gccggtgcca acccgatggc tctcaagcgc 120

ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggccgctgc tggagcaggc gaaggatgtc 180

gagaccaagg agcagatcgc ttccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240

gagctcatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300

tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggta tgcgcttcga caagggctac 360



atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg cgtcctcga cgacccgtac 420

420 <210> 17 <211> 420 <212> DNA <213> S. scabiei Korea isolate

Kangwon-S34 <400> 17 aagaagacgg acgacgtagc cggtagcggc acgacgaccg cgaccgtcct

ggcccaggcg 60 ctgggccgag aaggcctgcg caacgtcgcc gccgggtgcca acccgatggc

cctgaagcgc 120 ggtatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggtgcgctgc tcgaccaggc

caaggaggtc 180 gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac

ccagatcggc 240 gagctcatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac

cgtcaggag 300 tcgcagacct tcgggctcga gcttgagctc accgagggca tgcgcttcga

caagggtac 360 atctcggcgt acttcgcgac cgacatggag cgcattggagg ccgtgctcga

ggaccctac 420

420 <210> 18 <211> 420 <212> DNA <213> S. acidiscabies Korea isolate

Jeju-H20 <400> 18 aagaagacgg acgacgtagc cggcgacggc acgacgaccg cgacggctct

ggcccaggcc 60 ctgggccgag agggcctccg caacgtcgcc gccggcgcca acccgatggc

cctcaagcgc 120 ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggcgcgctcc tggagcaggc

gaaggacgtc 180 gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac

ccagatcggc 240 gagctcatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac

cgtcaggag 300 tcccagacct tcggtctgga gctggaactc accgagggca tgcgcttcga

caagggtac 360 atctcggcct acttcgcgac cgacatggag cgtatggagg cgtccctgga

cgaccgtac 420

420 <210> 19 <211> 420 <212> DNA <213> S. acidiscabies Korea isolate

Kangwon-S71 <400> 19 aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggc acgacgaccg cgacggctct

```

ggcccaggca      60 ctggtccgcg agggcctccg caacgtcgcc gccggcgcca acccgatggc
cctgaagcgc     120 ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggcgccctgc tggagcaggc
gaaggacgtc     180 gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac
ccagatcggc     240 gagctcatcg ccgaggcgat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac
ggtcgaggag     300 tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggca tgcgcttcga
caagggtac      360 atctcggcgt acttcgcgac cgacatggag cgtatggagg cgtccctgga
cgacccgtac     420

```

420 <210> 20 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

forward primer STGROF1 <400> 20 ccatcgccaa ggagatcgag ct

22 <210> 21 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

reverse primer STGROR2 <400> 21 tgaagtgcc rcgatcttg tt